

CT

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-500580

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)1月19日

(51) Int.Cl.⁸

A 6 1 K 38/00

識別記号

ADP

庁内整理番号

8314-4C

F I

A 6 1 K 37/02

ADP

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平5-504766
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)9月9日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)3月9日
 (86) 国際出願番号 PCT/AU92/00480
 (87) 国際公開番号 WO93/04690
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)3月18日
 (31) 優先権主張番号 PK8279
 (32) 優先日 1991年9月9日
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, CA, J P, US

(71) 出願人 ベプチド テクノロジー リミテッド
 オーストラリア国 2099 ニュー サウス
 ウェールズ ディー ホワイ インマン
 ロード 4-10
 (71) 出願人 キングス カレッジ ロンドン
 イギリス国 WC2R 2LS ロンドン
 ザ ストランド (番地なし)
 (72) 発明者 ミカエリス, ジューゲン
 オーストラリア国 2118 ニュー サウス
 ウェールズ カーリングフォード ホニ
 トン アヴェニュー イースト 10
 (74) 代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病の合併症及び病因の処理方法

(57) 【要約】

本発明は糖尿病の合併症と病因との治療のための方法を提供する。この方法は (β-Ala-His)_n、(Lys-His)_n、式 R₁-x-R₂ の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る媒体、ここで n は 2-5 であり、R₁ は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファアミノが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、R₂ は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファカルボキシルが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び X は R₃-L 又は D-His(R₄)-R₅ であり、ここで R₃ は空位か又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子の ω-アミノアシルであり、R₄ は空位又はアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、R₅ は空位又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物

を備えた組成物の糖尿病患者への投与を包含する。好ましくはその化合物はカルノシンである。

請求の範囲

1. $(\beta\text{-Ala-His})_n$, $(\text{Lys-His})_n$, 式 $\text{R}_1\text{-x-R}_2$ の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る塩類、ここで n は 2-5 であり、 R_1 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファアミノが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、 R_2 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファカルボキシルが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び X は $\text{R}_3\text{-L}$ 又は $\text{D-His}(\text{R}_4)\text{-R}_5$ であり、ここで R_3 は空位か又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子の ω -アミノアルシルであり、 R_4 は空位又はアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、 R_5 は空位又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物を得る組成物を薬液に投与することを備えた糖尿病患者における合併症と糖尿病の病因の治療方法。

2. 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の方法。

3. 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第 2 項記載の方法。

4. R_1 と R_2 が L-又は D-リジン又は L-又は D-アスパラギン酸又は L-又は D-グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の方法。

5. 前記組成物がさらにアミノグアニジンを含めることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 4 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

6. 前記組成物がインシュリンスルホン酸、ピグアニジン及び／又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 5 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

7. 前記組成物が注射、注入、摂取、吸入、点滴、イオン導入法又は局所付加

13. 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の使用。

14. 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の使用。

15. R_1 と R_2 が L-又は D-リジン又は L-又は D-アスパラギン酸又は L-又は D-グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の使用。

16. 前記薬がさらにアミノグアニジンを含めることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 15 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

17. 前記薬がインシュリンスルホン酸、ピグアニジン及び／又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 16 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

18. 前記薬が注射、注入、摂取、吸入、点滴、イオン導入法又は局所付加によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 17 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

19. 前記薬が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 18 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

20. 前記化合物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収／吸着、皮膚感作及び／又は皮膚刺激に關しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第 1 項から第 19 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

21. 前記分子が、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 20 項記載の使用。

22. 前記化合物が糖尿病状態の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 21 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 6 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

8. 前記組成物が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

9. 前記組成物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収／吸着、皮膚感作及び／又は皮膚刺激に關しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第 1 項から第 7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

10. 前記分子が、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 9 項記載の方法。

11. 前記化合物が糖尿病状態の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 10 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

12. 糖尿病の合併症と病因の治療のための薬の調製において、 $(\beta\text{-Ala-His})_n$, $(\text{Lys-His})_n$, 式 $\text{R}_1\text{-x-R}_2$ の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る塩類、ここで n は 2-5 であり、 R_1 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファアミノが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、 R_2 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファカルボキシルが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び X は $\text{R}_3\text{-L}$ 又は $\text{D-His}(\text{R}_4)\text{-R}_5$ であり、ここで R_3 は空位か又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子の ω -アミノアルシルであり、 R_4 は空位又はアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、 R_5 は空位又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物の使用。

明 細 書

糖尿病の合併症及び病因の処理方法

本発明は、糖尿病の合併症と病因の処理方法に關する。

ジベプチドであるカルノシンは、肉から得られる熱安定性抽出物質として、約 90 年前に発見された (Gulevitch と Asiradsi, 1990)。以来これら初期の原物質については、ジベプチドの分布と代謝に關する多くのデータが蓄積された。カルノシン (β -アラニル-L-ヒスチジン)、及びアンセリン (β -アラニル-L-メチル-L-ヒスチジン) やホモカルノシン (γ -アミノ- β -チリル-L-ヒスチジン) のような、その関連化合物は、多数の哺乳動物の骨格筋肉 (2-20 mM) や脳 (0.3-5 mM) を含む組織に、ミリモル濃度で存在している。ジベプチドのこの群の、生理学的機能を説明するための統一された仮説は存在していないが、それらの抗酸化特性、放射線障害からの DNA の保護能力、二價カチオンのキレート能、生理的 pH 値での顕著な緩衝能力から、それらのインビボでの主要な機能が、タンパク質、脂質及び他の巨大分子を保護するものであるとの提案がなされた。

自由ラジカル捕獲剤としての機能に付け加えて、カルノシンは「免疫調整剤」として作用し (ナガイ (Nagai) 特許: GB 2143732A)、それは、ある種の癌治療に有効な性質を持つことが主張されている (ナガイ、特許 DE 3424781A1)。カルノシンは、過酸化脂質に誘起された自内腫の治癒にも有効であることが示された (Bavitharev, 1989)。また、カルノシンは、外傷の治癒過程を促進できるという証拠もある。

非酵素的グリコシレーション (glycosylation)

自由ラジカル障害は、タンパク質及び核酸の構造に作用する唯一の過程ではない。非酵素的グリコシレーション (グリケーション (glycation)) である。食物化学におけるメイラード反応 (メイラード、1912) または褐色反応は、アミノ基と糖アルデヒドまたはケトン基との反応を含み、それは炭性アミノ基を生成し、結局グリコシレーションが進行した最終生成物 (advanced-glycosylation-end-pr

oducts) (AGE-生成物) を形成する。インビボでのグリケーションは遅いが、機能的に重要なものは、老いること、及び血糖レベルが上昇する、即ち糖尿病という病理学的状況である。

タンパク質のグリケーションは試験管の中で実施することができる。いくつかの研究により、ほとんどのタンパク質とDNAが、非酵素的グリコシレーションの潜在的ターゲットであり、そこでは、糖が分子のアミノ基に、シッフ塩基を通して結合し結めるということが示された。引続き再配列が起こり、着色された生成物を生ずる(アマドリ生成物と呼ばれる)。さらに、アマドリ生成物の速く特定されていない反応が起こる。

タンパク質中の好ましいグリケーション部位の分析により、リジン残基のεアミノ基が、特にヒスチジン残基に近接しているとき、主要な目標になることが示された(Shilton と Walton, 1991)。インビボでの長い半減期を持つ安定なペプチドの探索において、カルノシンのアミノ配列がレゾー-Hisに類似しており、糖と反応し、アルデヒド補足剤として反応する能力を有していることを見いだした。さらに、カルノシンは実質的に非毒性であり、よく証明された毒性試験によれば、その材料は哺乳類に5-10g/kgのレベルまで投与することができ、長期間の治療にわたって毒性副作用は予想されないことを示した。

その他のただ一つの化合物だけが、糖と反応し、アマドリ再配列を遮断することにより、グリケーションを遅延化することが示された。アミノグアニジンは、インビボとインビトロの両方で、グルコース誘起のグリケーションが進行した最終生成物を減少させる。不幸にも求得的なヒドラジンであるアミノグアニジンは、非生理的であり、知られていない長期の毒性がある。

糖尿病

糖尿病は、インシュリンの急性または慢性欠乏に起因する代謝上の疾患である。これは、血糖グルコースレベルの上昇によって診断される。急性状態は、インシュリン依存性組織のグルコース取り込みの減少によって特徴づけられる。生体は、その結果生ずる脂肪分解の増加とグリコーゲン合成の減少によるエネルギー欠乏を中和する。糖尿病の病状が重篤であるとき、熱量は2つの主要な源から失われ

な効果を有していると思われる。

グリケーションとアテローム性動脈硬化症

最近の研究により、AGEがアテローム性動脈硬化症の進行において機能を持っているかもしれないことが示唆されている。これは、ヒトの単球が、その表面にAGE特異性レセプターを有しており、リリーシング(releasing)シトキンによって刺激されたとき応答するという発見に基づいている。血管壁に対する小さな障害は、サブ-内皮AGEに晒し、単球の透過を促進し、アテローム性動脈硬化症の進行を開始する。循環しているリポタンパクもまたグリケーションを受け、それは、グリケーションされていないリポタンパクより早い速度で内皮細胞によって取り込まれる。これは、糖尿病において重要であり、グリケーションされたリポタンパクの血中レベルの上昇が報告されている。従って、カルノシンのような低グリケーション特性を有する化合物は、血管の疾患に積極的な効果を持つ。

糖尿病性合併症の理由は十分に理解されていないので、断続的な過血糖状態を避けるために必要なグルコース濃度の変化に反応して、皮下注射後にインシュリンを連続的に放出することは、適当ではないかもしれない。従って、糖尿病の血糖レベルは、平均して健康人より高く、それはグリケーションのレベルの増加をもたらす。最もよい例は、グリコヘモグロビンであり、それは糖尿病グルコースレベルに比例した量が赤血球中で非酵素的に形成する。グリケーションされたヘモグロビンと血清アルブミンの割合が高いことは、糖尿病の過血糖の度合の監視に使用される。

血中の高いグルコースレベルの長期にわたる影響を中和する化合物の、制御された食餌の摂取を、アミリン遮断剤での、インシュリン投与、スルホニル尿素とビグアニド(biguanide)処理のような制御された糖尿病治療に付け加えることは有効であろう。グリケーションに参加するのは、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リボース及びデオキシリボースのような還元糖の開環形態だけである。この自由アルデヒド基を捕捉し、それを非毒性形態に結合させることにより、インビボ及びインビトロでの高い血糖レベルに起因する傷害を減少できるものと信じている。合併症と病理の処理のために提案された化合物は、以下の特徴のうら

る。即ち、グルコースは尿で失われ、体タンパク質もまた失われる。これは、インシュリンが促進する腸胃から奪かれるアミノ酸からの糖新生が不十分だからである。急性の病状は、インシュリン注射によって制御できるが、その制御は決して完璧にはできないので、糖尿病の長期にわたる寿命は、生涯の後期に、目(白内障発生や糖尿病性)、腎臓(腎臓病)、神経(神経症)、及び血管(血管症やアテローム性動脈硬化症(atherosclerosis))において起こる合併症に依存する。冠状心疾患は、糖尿病及び非糖尿病も同様に、最も一般的な死因であることは充分確証されている。

炭タンパクの分析は、糖尿病患者の重大な腎臓疾患(腎臓病)の存在を排除するために通常要求される。炭タンパク結果が正であることは、一過性または重要でない腎臓疾患の発見であるかもしれないし、あるいは腎臓障害の初期徴候であるかもしれない。最も重大なタンパク尿は、腎臓症候群、ハイパーテンション、及び進行している腎臓障害と関連している。これらの条件下では、腎糸球体は、タンパク質の透過性が上昇するが、その機構はあまり解明されていない。その影響は、全腎臓障害をむしろ急速に促進させ、最終的に死に至らしめるので非常に重大である。このタンパク尿の生成は、糖尿病、脂質貯留症、紅斑性狼瘡のような疾患の二次的帰結として起こる。

糖尿病の他の合併症として、網膜疾患の進行におけるグリケーションの潜在的役割を考慮に入れなければならない。網膜毛細管は、毛細管内腔を占めて並び、透過性(血液-網膜)障壁を形成する内皮細胞、及び周皮細胞(星細胞)を含んでおり、それらは、その2つの細胞タイプにより生成される基底膜で包まれている。糖尿病性網膜疾患の初期段階において、星細胞周皮細胞は選択的に失われ、基底膜を取り囲んだゴーストのような質を放出する。血液-網膜障壁の破壊は、もうひとつの故障である。アルドース還元酵素阻害剤が、動物の実験的網膜疾患の治療において研究されている。それらの作用の機構は、ソルビトールの蓄積と、結果としての浸透性の変化を障害することである。しかし、ハメスラ(Hamess et al.) (1991) が、アミノグアニジンが実験的糖尿病性網膜疾患の進行を阻害することを示したという事実から、非酵素的グリコシレーションとの結合が明らかになった。カルノシンのような他の潜在的なグリケーション阻害剤も積極的

のひとつまたはそれ以上を有するペプチドである。

- 1) 比較的高い投与量においても非毒性であること。
- 2) 基内の非特異的プロテアーゼによって開裂されず、完全に血液または器官に吸収されること。しかし、腎臓によってクリアされ、それによって糖尿病のグルコースとして類似の組織に分布させること。
- 3) そのペプチドは、タンパク質表面のアミノ基に比較して、還元糖と速く反応すること。
- 4) 最終的にグリケーションしたペプチドは、グリケーションしたアミノ酸とは逆に、突然変異原性とならないこと。
- 5) そのペプチドが血液または組織中の特異的プロテアーゼにより開裂したならば、結果的なアミノ酸は、糖尿病の治療価値がある。例えば糖新生を促進したり良の血糖平衡を中和したりすること。

発明の要約

本発明者らは、カルノシンと類似の特性を持つペプチドは、糖尿病の合併症及び病因の処理に有効であると信ずる。

従って、第1の態様において、本発明は、糖尿病の合併症及び病因の処理方法である。その処理方法では、糖尿病患者へ(β-Ala-His)n、(Lys-His)n、一般式R1-X-R2の化合物、それらの製薬上許容される塩、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる化合物と、製薬上許容されるキャリアからなる組成物を投与する。ここで、nは2-5、R1は1または2の天然発生(natural occurring)アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでエステル化されたα-カルボキシルを有しているもよい。また、XはR3-1またはD-His(R4)-R5であって、R3は空位または炭素数1から12、好ましくは2から6のω-アミノアルキルである。R4は空位またはアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で置換されたイミダゾールであり、R5は空位または炭素数1から1

2、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

第2の態様において、本発明は、 $(\beta\text{-Ala-His})_n$ 、 $(\text{Lys-His})_n$ 、一般式 $\text{R}_1\text{-X-R}_2$ の化合物、それらの製薬上許容される塩、及びそれらの組合せからなる群から選ばれた化合物の、糖尿病の合併症及び病因の処理用医薬の合成における用途である。ここで、 n は2-5、 R_1 は1または2の天然発生アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラキルでエステル化された α -カルボキシルを有していてもよい。 R_2 は1または2の天然発生アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラキルでアセチル化された α -アミノを有していてもよい。また、 X は $\text{R}_3\text{-L}$ または $\text{D-His}(\text{R}_4)\text{-R}_5$ であって、 R_3 は空位または炭素数1から12、好ましくは2から6の ω -アミノアルキルである。 R_4 は空位またはアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で修飾されたイミダゾールであり、 R_5 はボイドまたは炭素数1から12、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

本発明の好ましい実施態様では、 R_1 及び R_2 は、 L- または D- リジンあるいは L- または D- アスパラギン酸あるいは L- または D- グルタミン酸あるいはそれらの相同体である。本発明の好ましい実施態様では、その化合物はカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、 D- カルノシン、及びカルニシンからなる群から選ばれ、最も好適には、化合物はカルノシンである。

本発明のさらに好ましい実施態様では、その組成物は、アミノグアニジンのような、糖尿病の合併症及び病因の処理に有効な効果を有する他の化合物を含む。

さらに、多くの治療されるべき患者が、インシュリンスルホン酸、ビッグアニド、またはアミリン遮断治療を受けていてもよく、本発明の組成物は、そのインシュリンスルホン酸、ビッグアニド、またはアミリン遮断治療と共投与してもよい。

スルホン酸ビッグアニド治療についてのさらなる情報は、ベッカーニールセン(Beck-Nielsen)の"Pharmacology of Diabetes", C.E.Nielsen と C.Stan dl 編、1991, pp75-92, そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

上で述べたように、その組成物は注射によって投与してもよい。例えば、無菌の注射可能な水性もしくは油性懸濁液のような注射可能な薬剤は、適宜の分散または溶解剤及び懸濁剤を使用して、当業者によく知られた方法に従って製法できる。その無菌の注射可能な薬剤は、非毒性で非経口に許容される薬剤または溶液中の、無菌注射可能な溶液または懸濁液でもよい。採用してよい媒体及び溶媒は、水、リンゲル液、及び生理食塩水である。さらに、無菌の固定油(fixed oil)は、溶液または懸濁液として、従来通り採用することができる。この目的のために、合成モノグリセリドを含む任意の種々な固定油を採用してよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能な薬剤で使用できることがわかった。

その組成物の投与すべき毎日の全投与量は、治療されるべき宿主及び、特に投与方法に依存するだろう。ある特定の患者への特定の投与量レベルは、採用されたその特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康、性、食餌、投与時間、投与経路、禁忌薬、及び患者が受ける副作用の重さを含む要因の変化に依存することは理解できるであろう。必要とされる投与量レベルの選択は、この分野の熟達した者の専門的技術の範囲内であると思われる。

カルノシンの投与量は、20 mg から 2 g/体重 kg/日であり、好ましくは100 mg から 200 mg/体重 kg/日であろうと思われる。

上で述べたように、糖尿病に関連した合併症のひとつは白内障である。従って、本発明の組成物の投与の特に好ましい形態は、点眼である。この状況において、製薬上許容されるキャリアは、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液、乳化液、及び軟膏である。点眼に適した製薬上許容される媒体の例は、プロピレングリコール及び、製薬上許容されるアルコール、ゴマまたはヒナツツ油及び他の製薬上許容される油、石油ゼリー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース塩、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのような水溶性の塩に許容される非毒性ポリマー、ポリアクリル酸塩、アクリル酸エチル、ポリアクリルアミドのようなアクリレート、ゼラチン、アルギネート、ペクチンのような天然物、酢酸デンプン、ヒドロキシエチルデンプンエーテル、ヒドロキシプロピルデンプンのようなデンプン誘導体、同様に、ポリビニルアルコール、ポ

リビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレングリコール、カルボボル(carbopol)及びキサンタンガムのような合成誘導体、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、緩衝剤、保存剤、溶解剤、乳化分散剤のような補薬を含んでもよい。好ましい保存剤は、四塩アンモニウム化合物、フェニル水銀塩、ベンゾイルアルコール、フェニルエタノールなどの抗菌剤、及びメチルスルフィドナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ボレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点目の組成物はソリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

インシュリン治療の大きな欠点のうちのひとつは、注射を継続して必要とすることである。本発明は、カルノシンと、ビッグアニドまたはスルホン酸ととの経口投与による他の方法を提供でき、それは糖尿病に対してより効果的である。

本発明の組成物は、注射、注入、摂取、吸入イオン浸透療法、または局所塗布のような任意の方法で投与することができる。しかし現時点では、経口で投与するのが好ましい。

さらに好ましい具体例では、活性化合物は、組成物の皮膚浸透、皮膚塗布、組織吸収/浸透、皮膚感作、及び/または皮膚刺激を改善するような他の分子と結合または結合している。その分子は、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、エタノール及びそれらの混合物からなる群から選ばれるのが好ましい。

その化合物は、薬前駆体(prodrug)の形態であってもよい。プロドラッグ技術のさらなる情報は、「医薬品デザインと発達のテキストブック(A Text Book of Drug Design and Development)」、ポブル・クログスガード・ラーセンとハンス・ブンドガード(Povl Krosgaard-Larsen and Hans Bundgaard) 編、5章「プロドラッグのデザインと応用(Design and Application of Prodrugs)」、H. ブンドガードに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロス・リファレンス(cross-reference)として含まれている。

上で述べたように、本発明の組成物は経口投与されるのが好ましい。当業者には理解されるように、その組成物を経口デリバリー(delivery)への適合性を改善するような多くの修飾をなすことができる。経口デリバリーのさらなる情報は、「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリー(Peptide and Protein Drug Delivery)」、ビンセント H. L. リー(Vincent H.L. Lee) 編、16章「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリーの経口経路(Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery)」、V. H. L. リーらに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロス・リファレンスとして含まれている。

リビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレングリコール、カルボボル(carbopol)及びキサンタンガムのような合成誘導体、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、緩衝剤、保存剤、溶解剤、乳化分散剤のような補薬を含んでもよい。好ましい保存剤は、四塩アンモニウム化合物、フェニル水銀塩、ベンゾイルアルコール、フェニルエタノールなどの抗菌剤、及びメチルスルフィドナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ボレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点目の組成物はソリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

これまでの議論で明らかのように、糖尿病の合併症及び病因は、非酵素的グリコシレーションを減少または防止することによって処理できる。従って、本発明の方法は、非酵素的グリコシレーションによる他の疾患状態の、他の有害な合併症及び病因の処理に有効であることが予想できる。

本発明の性質がより明確に理解されるために、好ましい形態を、以下の実施例及び図面を参照して説明する。

第1図は、 L- カルノシンと糖との反応速度を示す。 L- カルノシン(60 mM)は、pH7の50 mMナトリウム-リン酸緩衝液中で、5時間60℃で、糖(180 mM)と反応させ、カルノシンの自由アミノ基の減少を、HPLCによって検定した。SEM(培養混合物中の全カルノシンの $\pm 1\%$)

第2図は、カルノシンのアテローム性動脈硬化症に対する影響を示す。(ニコレスチロール、 \square コレステロール+カルノシン)

第3図は、糖尿病ラットにおける白内障の形成に対するカルノシンの影響を示す。(図様本、図様本、 \square 糖尿病+カルノシン)。

発明の詳細な説明

方法

糖に対するペプチドとアミノ酸誘導体との反応

別の方法を除き、反応は、60℃の水浴中、密封されたマイクロ通心分離用バイアルの中、リン酸塩で緩衝化された塩溶液、PBS、(140 mlのNaCl/

10 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.4)で行われる。反応混合物は、50 mMのヘプタドと、500 mMの鹽を含む。指定条件の時間のポイント毎にサンプルが取られ、水で1:20に希釈され、HPLCによる分析の前は-20℃で置かれる。

アミノ基の検出

ヘプタドの産生アミノ基の検出のためには、ウォーターズオート、(Waters AUTO) OPATMが使用される(Waters AUTO, TAGTM操作使用)。簡単に言うと、ヘプタドは、o-フタルアルデヒドと反応され、蛍光性の誘導体が、溶媒として15分間にわたって10%から90%(容量/容量)のメタノールの勾配を用いたラジカルPAKTM C18カラム上のHPLCにより分離される。励起340 nm/原料440 nmのウォーターズ470蛍光検出セット(Waters 470 fluorescence detector set)が使用される。

グリケートした蛋白質(Glycated Proteins)のHPLC特性のグルコースクロマトグラフィー:

カラム スパロース6 (Superose 6), ファーマシア (Pharmacia)

試料: 蛋白質の試料 (約100 μg) の100 μl

溶媒: 10 mMのリン酸緩衝液 pH 7.38, 140 mMのNaCl, 2 mMのKCl, 0.02%のNaN₃, 0.05%のツイン(Tween) 20

流速 (FLOW RATE): 0.5 ml/min

検出: 280 nm

校正はファーマシア (Pharmacia) の高分子量 (HMW) と低分子量 (LMW) との校正キットを用いて成される。

校正成分	分子量	保持時間	
HMW ブルーデキストラン	>2,000,000	15.49	n=5
チログロブリン	669,000	25.84	n=6
フェリチン	440,000	29.73	n=5
カタラーゼ	232,000	32.58	n=6
アルドラーゼ	158,000 共溶出	32.58	n=6

リー (Kaiser's Glycerol Jelly) が設置される。障害が起きた部分は、直接に、画像分析 (アイコン (Eye com) 850画像プロセッサ) を用い、障害部分を直接測定する。コンピュータを用いた面積測定は、影響を受けた領域のパーセンテージを肉眼的に決定するのに用いられる。アテローム性動脈硬化症のプラークの代表的な部分は、光学顕微鏡法による確認のために、取り除かれる。結果は、平均±SEMとして表される。

糖尿病のネズミの中の白内障の形成

200-250 gの重さで、主後6週間の雄のスプレイツグウェイ (Sprague-Dawley) ネズミは、次の三つの処理グループ: コントロール、糖尿病、カルノシンで処理された糖尿病のネズミを無作為に使用した。糖尿病は、ストレプトゾトシン (streptozotocin) STD (くんん酸緩衝液、pH 4.5中、体の重量に対し60 mg/kg) で引き起こさせ、一週間後、20 mM以上の血糖のグルコースのレベルを持つ全ての動物が研究に含まれる。糖尿病のネズミは、治療されてないもの、または、飲料水中に2%のカルノシンを受けたものが無作為に化される。

結果

実験例1

糖とカルノシンの反応

グリケーション (glycation) 中のアルデヒドとアミノ基との間の反応速度は、単に温度だけでなく、反応物の濃度にも依存し、このように、平衡の影響を受けない反応の速度を上げるために、主体外での実験中、非生理的な条件の使用が許される。メイラード反応の中の最初のステップは、アルデヒドと一次のアミノ基の間の Schiff 塩基の形成であり、糖の直鎖状の環の形の量にしたがって変化する。これはアマドリ転位と複雑な二次反応による結果として起こり、多くは十分に理解されていない。

グルコース、ガラクトース、カルノシンを持つジヒドロキシアセトン (dihydroxyacetone (DHA)) のインキュベーションは、メイラード (1912) により最初に述べられたように、グリケーションの特色として茶色の溶液を生ずる。糖とカルノシンの反応は、HPLC後に、蛍光定量的に測定された遊離アミノ基の消失をもたらす。グルコース、ガラクトース、DHAは、それらとカルノシ

LMW ブルーデキストラン	>2,000,000	15.65	n=5
アルブミン	67,000	33.74	n=6
オボアルブミン	43,000	35.57	n=5
ネモトリブシンA	25,000	39.23	n=6
リボスクレアーゼA	13,700 共溶出	39.23	n=6

置換化合物の受容体異質性の存在性の分析、"エイムズ試験"

グリケートした化合物の準備が、キム (Kim) ら (1991) にしたがって成される。簡単に言えば、D-グルコース (1 M) と、次のそれぞれ: L-カルノシン、L-リジジン、L-アラニン (全て 1 M) とが蒸留水中に溶解され、pHが7に調整され、混合物が100℃で80分間加熱される。各液 (50 μl と 250 μl) は、標準的なネズミ肝臓のミクロソーム (S-9) の準備による代謝活性を用い、または、用いずに、プレート導入方法 (Maron & Ames, 1983) を使用するネズミナフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA 100株に対する評価を行う。2-AFと2-AAFとは、代謝酵素を持つ試験のために、陽性コントロールとして使用され、さもなければ、ナトリウム アジ化物が、特別な陽性コントロールの菌株として含まれる。

アテローム性動脈硬化のカルノシンの効果

高いコレステロール (2%) 飼料で飼育された雄のニュージージーランドホワイトクロスラビットが、コントロール、またはカルノシン処理2%のために無作為に使用され、そして、血液がコレステロールとトリグリセリドとカルノシンとのために検査される。全ての動物は、一日当たり食料ペレット100 gの給餌とし、水は自由摂取とした。

8週間の処理期間の後、各ラビットは、ペントバルビタール (325 mg/kg) を用いて麻酔し、全ての大動脈を取り除く。首の、胸の、腹部の領域は最初の一片の動脈の動脈と腹腔の動脈の上方0.3 cmとに最も近い周囲1 cmの大動脈を切るにより分離する。動脈血管外膜を注意深く切り取り、動脈は、腸管内臓の表面をさすように縦に切断する。大動脈は、48時間、10%のホルマリン緩衝液の中で処理される。これらの血管の中の脂肪プラークがスーダン IV (Sudan IV) を用いて染色され、さらに水性媒体 (カイザーズグリセロールゼ

ンとの反応において異なる (第1図)。グルコースは、反応性が少なく、DHAが多く、少なくとも15倍の差を示す。その阻害性のために我々は以後の連続した多くの研究の中で、トリオースDHAの使用を選択した。

実験例2

カルノシンによるウシ血清アルブミンの形成を誘発するジヒドロキシアセトンの阻害

ウシ血清アルブミン (50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pHが7.0で、50 mg/ml) の生理学的濃度は、4週間のあいだ23℃で、250 mMのL-カルノシンの存在と不在とにおいて250 mMのジヒドロキシアセトンを用い、または、これを用いなくてインキュベートされる。実験は無菌の状態で行われ、イオン強度は全てのバイアル中で同一である。結果を、第1表に示す。

この長期間の実験において、ジヒドロキシアセトンは、グリケートしたアルブミンを有し、アマドリ転位の結果として、引き続いて、糖はグルの形成を誘発する。カルノシンが存在するときはバイアルの中身は糖のままである。

第1表

インキュベーション条件

結果物の効果

アルブミン+リン酸緩衝液	無色、溶液
アルブミン+ジヒドロキシアセトン	茶色、強いゲル
アルブミン+ジヒドロキシアセトン	暗い茶色、溶液

ウシ血清アルブミンの非酵素的なグリコシレーションのジヒドロキシアセトン誘発に関するカルノシンの効果。

実験例3

カルノシン及び異なるアミノ酸とグルコースとの反応速度の比較

蛋白質とグルコースによる糖と糖との様々な非酵素的なグリコシレーションは、生理学的な値から50℃にまで温度を引き上げることにより、インビトロで促進される。インビボ及びインビトロのグルコースの主なターゲットは、塩基性のアミノ酸リジンとアルギニン (遊離か、蛋白質中の混合かのいずれか) である。第2表はカルノシン及び異なるアミノ酸とグルコースとの反応の比較を示す。還元糖のためのメイラード反応の特異性を示すために、グルコースは、ソルビトール

(非還元糖)により置換される。グルコースまたはソルビトール(50 mMのリ
ン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0の中、250 mg/ml)の500 μ lは、
18時間、50℃で、異なるアミノ酸またはカルノシン(500 mM)を用いて
インキュベートされる。その結果生じる溶液の400 nmの光学濃度が測定され
る(表2)。カルノシンは、最も早く反応するアミノ酸、L-リジン又はベータ
-アラニンの各々よりも、約2倍、または、8倍以上に、より多くのメイラード
反応生成物を形成する。少量のメイラード反応の生成物は、カルノシンがソルビ
トールと反応したときに、多分還元糖へのソルビトールの自動酸化のために明白
となる。

[以下空白]

表2表

グルコース又はソルビトールとジペプチド又はアミノ酸との間のメイラード反応
生成物の400 nmでの吸光度

インキュベーション条件	OD 400 nm
グルコース+PBS	0.175
グルコース+カルノシン	8.455
ソルビトール+PBS	0.000
ソルビトール+カルノシン	0.209
カルノシン+PBS	0.041
グルコース+D, L-アラニン	0.266
ソルビトール+D, L-アラニン	0.008
グルコース+ベータ-アラニン	1.240
ソルビトール+ベータ-アラニン	0.010
グルコース+L-アルギニン	0.469
ソルビトール+L-アルギニン	0.010
グルコース+L-リジン	1.170
ソルビトール+L-リジン	0.009
グルコース+イミダゾール	0.046
ソルビトール+イミダゾール	0.035

表3表

カルノシン、関係するペプチド及びアミノ酸とジヒドロキシアセトンの反応

カルノシン、関係したペプチド及びアミノ酸に対するDHAの反応率を比較す
る(表3表)時に、カルノシンはリジンよりも速やかに反応し、ジペプチドがグ
リケーションのためのアミノ基の他のソースに対して競合できることを示唆して
いる。しかしながら、この定量化においてリジンはその反応に寄与する2つのアミ
ノ基を有しているのに、タンパク質中ではイプシロン アミノ基のみが有効に使
用される。イプシロンアミノ基の単独のグリケーション割合の比較は、アルファ
アミノ基を遮断する、N-アルファ-カルボベンゾキシル-リジン(Z-リジン

)が用いられる。DHAがZ-リジンのカルノシンの等モル混合液に添加される
時、そのジペプチドは遮断アミノ酸よりも速やかに、約10倍の反応をする(表
3表)。相対的な反応性は、グルコースが多量化の場として消費されるときに保
持され、その実験は10日間を完全に要する(表示せず)。蛋白質内に合併され
たリジン残基によく類似した分子であるAc-Lys-NHMeは、カルノシン
と比較してDHAとより速い反応を示した。ペプチドAc-Lys-His-NH₂は蛋白質中の優先のグリケーションサイトに類似し、カルノシン阻害のよう
な同様の作用を示した。ペプチドのベータ-アラニル-グリシンはDHAと實質
的に反応せず、確固たるグリケーションのためのペプチド中の2つの位置でヒス
チジンのための要求物が喪失される(ShiltonとWalton, 1991)。D-カルノ
シン(ベータ-アラニル-D-ヒスチジン)が自然出現アイソマーと同じくらい
速く反応する間に、より高い相対体の、相同カルノシン(ガンマ-アミノ-ブチ
リル-L-ヒスチジン)はゆっくりと反応した。これは、カルノシンに小さな構
造的変更(メチレン基の付加)がその反応性を減じていることを示す。それは
また、各種の基によるリジンの変型が反応率に関して意味のある効果を有してい
ることが明白となる。Ac-Lys-NHMe(遮断アミノとカルボキシル基
)がより速やかに反応するのに対し、Z-リジンは遮断アミノ酸よりもゆっくり
と反応した。

それはまた、遮断イミダゾールとサクシニルヒスチジン(アルファ-アミノ基
が遮断された)が、ジペプチドのアミノ基の消失の割合の増大によって示される
ようなDHAとカルノシンの反応性を増進させることが見出された。これは、ア
マドリ転移の触媒として又はAGE-主産物に向う反応の平衡をそれによって変
化させる中間の形態との反応のいずれか一方のイミダゾールであることの示唆と
一致している(ShiltonとWalton, 1991)。

[以下空白]

表3表

化合物	反応した%
A ベータ-Ala-L-His-OH	26
ベータ-Ala-D-His-OH	26
Ac-Lys-His-NH ₂	25
Ac-Lys-NHMe	21
H-Lys-OH	17
ガンマ-アミノ-ブチリル-His-OH	15
Z-Lis-OH	3
ベータ-Ala-Gly-OH	2

B ベータ-Ala-L-His-OH+サクシニル-His	33
ベータ-Ala-L-His-OH+イミダゾール	43

ペプチドのグリケーションとDHAによるアミノ酸阻害。

AとB: 化合物は60℃で5時間のあいだPBS中でDHAと反応させ、遮断
アミノ基の損失をHPLCによって定量化した。データはDHAと反応したアミ
ノ基のパーセントとして表現した(インキュベーション混合液中の全ペプチド又は
アミノ酸のSEM $\pm 1\%$)。B単独: サクシニル-Hisとイミダゾールはベ
ータ-Ala-L-His-OHと定量化した後のアミノ基に等モル濃度で添加し
た。

表4表

グリケート化アミノ酸とグリケート化カルノシンの実質原性の特徴

リジンとアルギニンのようなグリケート化アミノ酸(glycated amino acids)
は、MaronとAves (1983) "エイムス試験"によって最初に開示された分析システ

ムにおいて変異原性のあること (Eis ら, 1991) が報告されている。他のプロリンとシステインのようなグリケート化アミノ酸は変異原性が示されていない。我々は L-カルノシンの変異原性を調査し、また L-カルノシン、L-リジン及び L-アラニンからグリケート化している (第4表)。4つの濃度の全ては、特に 250 μ M 投与で、何等かの指示株の抑制が良われた。我々のデータでは、グリケート化された L-リジンが変異原性であり、それによって発癌性があるであろうという、Eis ら (1991) による前の結果と一致する。その活性は、ラット肝の S-9 代謝活性化システムによってわずかに増加する。グリケート化された L-アラニンは以前の報告では弱い変異原性であり、我々の実験においては変異原性でないことを示した。遊離カルノシンとグリケート化されたカルノシンの両方は変異原性ではなかった。これは、インビボのメイラード反応において意味のある役割をカルノシンが担っているであろうことが予測されるであろう。L-カルノシンと L-リジンのグリケート化の形態の差異の理由は知られていない。

[以下未白]

表4表

T A 100 によるプレート毎の復帰頻度			
化合物	投与 (μ l)	S-9 なし	S-9 あり
L-カルノシン	250	158 \pm 11	149 \pm 13
	50	154 \pm 14	179 \pm 15
グリケート化された L-カルノシン	250	142 \pm 17	158 \pm 19
	50	159 \pm 7	167 \pm 10
グリケート化された L-リジン	250	277 \pm 21	244 \pm 13
	50	357 \pm 17	553 \pm 19
グリケート化された L-アラニン	250	145 \pm 6	146 \pm 9
	50	160 \pm 9	181 \pm 10
陰性コントロール			
+ アジド		>1000	N/A
+ 2 A F		N/A	250 \pm 33
+ 2 A A F		N/A	500

グリケート化された化合物の変異原性ポテンシャル

サルモネラ タイフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) T A 100 は、his⁺ から his⁻ への突然変異系の指示株である。データはプレート毎の復帰

細胞の平均値と、ラット肝のミクロソーム的な (S-9) 調製物によって代謝性刺激の有るものと無いもののそれらの試験溶液とコントロールのための標準偏差とを表現した。

実験例6

経時的なグリコシレーションによる抑制としてのアミノグアニジンとカルノシンとの比較

ウシ血清アルブミン (BSA) とオボアルブミンのグリケーションに關するカルノシンとアミノグアニジンの両方の効果の比較は、DNA の一定量と、低グリケターズのいずれかについて濃度を変えたものとを 60°C でインキュベートしてなされた。反応の出現時点と7時間経過後の一定部分を取り、反応物の展開はスパーロス6 (Sperose 6) カラムによるゲルろ過によって分析した。蛋白質の架橋化とフラグメント状態は、コントロールとして使用した未処理の蛋白質と比較した保持時間中の変化として目に見えて明確となる。幾つかの化合物は、最も小さな化合物のために増強上の保持時間の後に現われた。それらは高いイオン濃度と界面活性剤 (ツィーン20) の存在で一種なカラム試験で妨害される傾向がある。それらは小さな化合物の必要性ではなく、むしろ高い充填度と反応性である。第5表にそのデータを要約する。2つの化合物はこのシステムにおいて別々に反応すると思われる: カルノシンは高分子量の化合物の形成が減少され、アミノグアニジンに比べ低い濃度で實質的により多くの効果がある。反応生成物が特許付けられない全てのアミノグアニジン試料は高濃度で慢性的に形成される (低分子量の形態 "LMW" として記載され、何故ならばその保持時間は他の全ての化合物での試験より長い)。アルブミンモノマーのピーク面積が減少されることから、これらはオボアルブミン、アミノグアニジンとDNAの間の反応生成物であろう。3つの化合物の全ては、保持時間又はピーク面積が7時間のあいた同様の条件のもとで別々にインキュベートされる時に変化しないことが示された。LMW はまた、オボアルブミンがインキュベーション混合物中のウシ血清アルブミンによって置換えられる時に観察される (表記せず)。そのLMWはカルノシン試料中に少しも存在していない。

表5表

オボアルブミン クロマトグラムの面積パーセント			
	HMW	モノマー	LMW
0 時間			
カルノシン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
アミノグアニジン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
7 時間後			
カルノシン試料			
[A]	9	91	0
[B]	6	94	0
[C]	3	97	0
[D]	25	75	0
[コントロール]	68	32	0
アミノグアニジン試料			
[A]	0	31	69
[B]	8	20	72
[C]	0	41	49
[D]	38	40	22
[コントロール]	68	32	0

凡例：オボアルブミンは、カルノシン又はアミノグアニジンのいずれか一方が各種の濃度で存在する中で7時間のあいだDHAと一緒にインキュベートした。反応生成物はゲルろ過カラム（スバロース6）で分離し、ピークは保持時間によって分離した：HMW、高分子量（15-30分）；アルブミンモノマー（35分）；及び遊離して流出する化合物LMW、低分子量（>40分）。カルノシンとアミノグアニジン濃度は【コントロール】0 mM、【A】600 mM、【B】300 mM、【C】100 mM、【D】50 mM。

抗-グリーケーターの有効性のために良い尺度は、反応の7時間後に残存する未反応のアルブミンの量である。この点でカルノシンはアミノグアニジンと比べ全ての濃度でより有効であった。

実施例7

アテローム硬化症におけるカルノシンの効果

冠状動脈心臓疾患は糖尿病及び同様に非糖尿病の最も多い死因の1つである。グリーケーションはアテローム性プラーク（atherosclerotic plaques）に加え、糖尿病性動脈硬化や目の疾患を含む多くの糖尿病合併症の進展を包含している。コレステロール結晶ウサギは8週間の期間を超えてアテローム性プラークに関するカルノシンの効果を試験に使用した。我々の研究では、カルノシンによりグリーケーションの抑制がプラーク形成を妨げ減じることができることを示している。これらの結果は第2図に示される。

そのデータのための2つのテールPはマン-ホイットニー（Mann-Whitney）の2サンプル試験を用いて算出した：胸部大動脈=0.0529；腹部大動脈=0.5368；大動脈弓=0.6623。全てのデータはアミノグアニジン（n=11）試験に対して糖尿病コントロール（n=12）。その他の動物は統計的により良い結果を与えるこの研究において使用した。しかしながら、これらは非酵素的グリコシル化の抑制の両方がプラーク形成を減じ得ないことを明確に示す。

その動物の体重は8週間の処理期間を超えて減少し、しかしながらコントロールとカルノシン処理群の間で差はなかった。

させるであろう。我々はストレプトゾトシンを導入した糖尿病ラットモデルにおいてこれを試験している。カルノシン食餌動物について8週後は、糖尿病コントロール群（Mann-Whitney 2サンプル試験、2テールp値=0.2092；カルノシン試験には糖尿病コントロール）に比べて高度な明瞭性（混濁なし）を示した（第3図参照）。これは56日で測定されて以来、実験の半路時点で、その傾向がカルノシン試験によって白内障の形成における減少として示される。

白内障は動物モデルにおける糖質の減少のみでなく誘発させることができる。バビズハエブ（Babishayev, 1989）は過酸化した脂質が動物モデルにおいて進展する糖尿病の開始的原因の1つとし得ることを示している。リボソームの懸濁物の注入は後方白内障の進展を誘発する過酸化した脂質を含むリン脂質から調製した。同様な白内障モデルによる彼の発見は過酸化した脂質に準に基づき、カルノシンと類似の抗酸化剤によって抑制し得る。メイラード反応生成物の形成は、しかしながら、経路に従わず、抗酸化剤によって影響を及ぼすことができる。

〔以下空白〕

コントロールに対するカルノシン処理において既述された各種器官の重量は差はなかった。

	体重 kg	
	0週	8週
コントロール	3.27 ± 0.09	2.75 ± 0.17
カルノシン	3.33 ± 0.09	2.68 ± 0.12

	8週経過後の器官の重量 (g)		
	肝臓	腎臓	心臓
コントロール	135.94 ± 5.06	16.20 ± 0.67	7.92 ± 0.53
カルノシン	124.40 ± 6.36	17.53 ± 0.69	6.12 ± 0.27

実施例8

糖尿病ラットにおける白内障の形成に関するカルノシンの効果

白内障は十分な視力が損なわれる眼球レンズの混濁化である。糖尿病は、白内障の原因の1つの形態が糖尿病であるということが多くの年月と多くの臨床試験で支持されるという観点により糖尿病と関連付けられている。動物中の糖尿病はストレプトゾトシン（streptozotocin）によって誘発させることができ、レンズの混濁は注射20日後により顕著に発生するが、遅い混濁は注射時の年齢によって約100日後に出現した。

レンズの蛋白質を含んだ蛋白質への糖質の白内障内転は、確認され、定量化されている。最も多数の組織では糖尿病において一様な後期のメイラード生成物の少しの蓄積があるが、レンズ中の蛋白質は早期のグリーケーション生成物の蓄積ばかりでなく、黄色のメイラード生成物に変化するそれらの時間を有する。化学的実在物と酵素の過酸化脂質の各種を生じる糖質の最初の攻撃は、蛋白質とレンズの結晶とそれら各々の経路が関係を生じ得る。糖質の反応性アルデヒド基を補足可能なそのものとカルノシンに類似する化合物とは白内障の開始を減少

実施例9

糖尿病ラットにおける蛋白質、グリーケート化したヘモグロビンと血中グルコースレベルに関するカルノシンの効果

8週で有意の変化のないことがパラメーターについて既述された。

	アルブミン値		
	通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
	2.4x / ± 1.3	2.51x / ± 1.07	2.51x / ± 1.48

	グリーケート化したヘモグロビン (HbA1c) パーセント		
	通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
	1.5 ± 0.1	4.83 ± 0.23	4.49 ± 0.14

	血中グルコース (mM 値 + SEM)		
	通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
	10.0 ± 1.5	29.84 ± 4.88	22.63 ± 3.00

蛋白質と明瞭性における変化は糖尿病条件の約30週後に唯一観察することができる。そのアミノグアニジン化合物、非酵素的なグリコシル化の防止のための有効な使用は、試験30週後の一様な糖尿病モデルにおいてグリーケート化したヘモグロビンの量が減少することはない。この研究は現在継続している。

明白に開示されたような発明の精神又は範囲から逸脱することなく、特有な実施例において示したような本発明により各種の変更及び/又は変形が形成されるであろうことは当業者においては明らかとなるであろう。本発明の実施例は、それ故、開示としての全ての関係において考慮されるものであり、それに限定されるものではない。

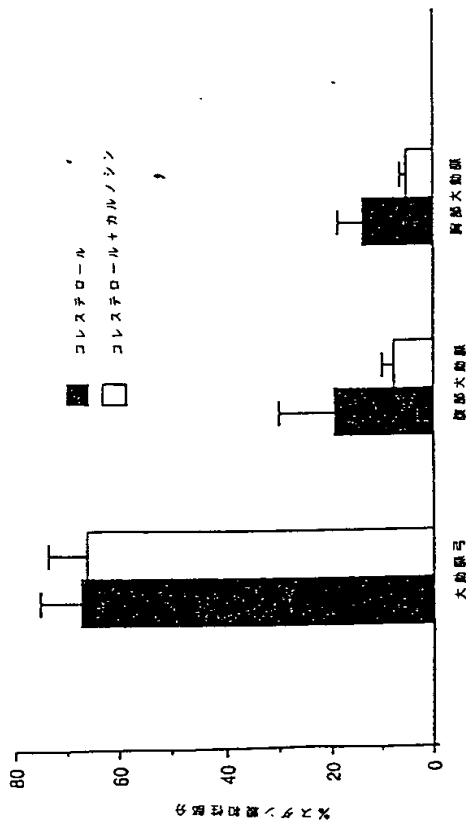
〔以下空白〕

文献:

- Gulevitch, V., と Amiradibi, S. (1900) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 1902-1903
- Maillard, L.C. (1912) C.R. Acad. Sci. 154, 66-68
- Shilton, B.H., と Walton, D.J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 5587-5592
- Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Brownlee (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 11555-11558
- Kim, S.B., Kim, I.S., Yeum, D.M. と Park, Y.H. (1991) Nut. Res. 254, 65-59
- Haron, D.M. と Ames, B.N. (1983) Mut. Res. 113, 173-215
- Babizhayev, M.A. (1989) Biochimica et Biophysica Acta 1004, 363-371

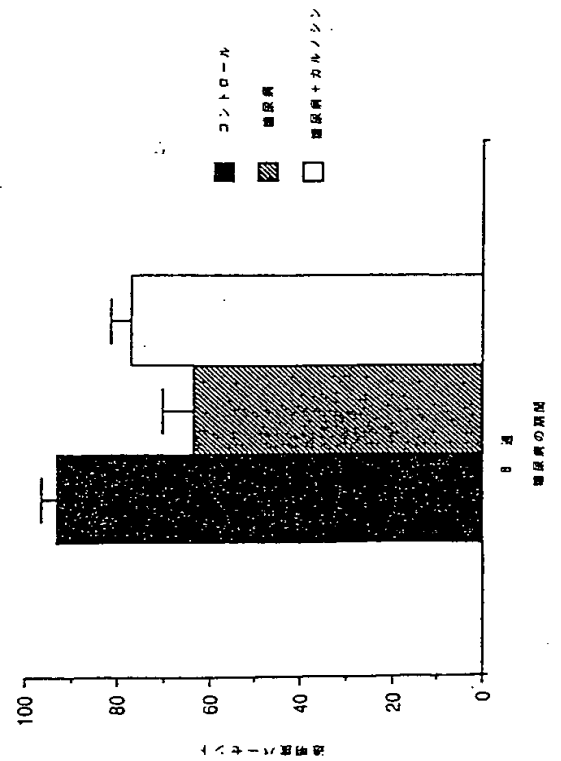
[以下空白]

アテローム硬化度



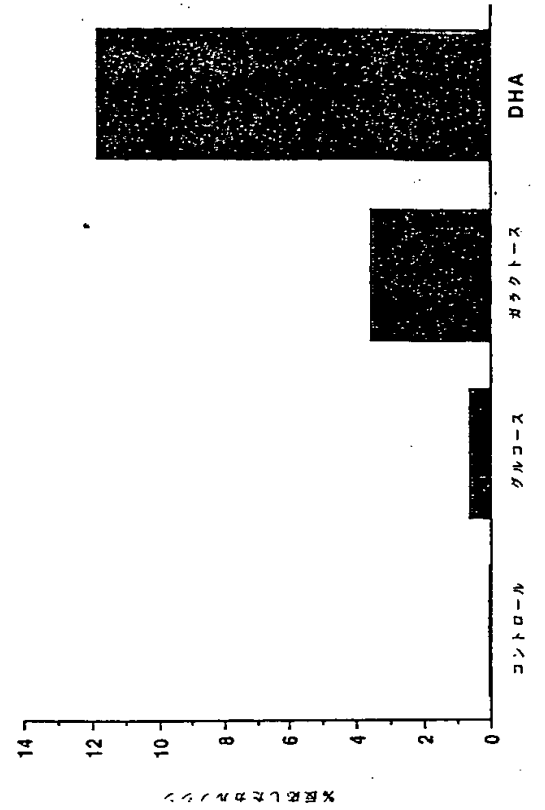
第2図

白州糖研究



第3図

カルノシンと糖の反応



第1図

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER In. Cl. 2 A61K 37/02	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Main group classification searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K 37/02	
Documentation searched other than main group classification in the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above	
Documents not searched during the international search (state of art base, and where practicable, search terms used) DERWENT: CHEM ABSTRACTS AND WPAT DATABASES USING THE KEYWORDS: CAJUNOSINE, HOMO CAJUNOSINE, ANSERINE, HOMO ANSERINE, OPHIDINE, CARCININE AND DIABETES	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X ✓	EP A 313564 (ZERIA PHARMACEUTICAL CO., LTD. AND HAMARI CHEMICALS, LTD.), 3 May 1989 (03.05.89) page 5 lines 11-16, page 7 lines 2-4
X ✓	EP A 303380 (HAMARI YAKUHIN KOTYO KABUSHIKI KAISHA), 15 February 1989 (15.02.89) page 2 lines 43-49, and the claims
X ✓	US A 4717716 (KINOSHITA NAGAI AND TAJIKI SUDA), 5 January 1988 (05.01.88) column 8 lines 39-44, columns 9-10 lines 2-4, and the claims
X	Further documents are listed in the continuation of Item C.
X	See parent family member.
Special categories of cited documents:	
A	document defining the present state of the art which is not considered to be of particular relevance
C	document published on or after the international filing date
L	document which may have priority over the priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of the priority claim(s) or other special status (as specified)
Q	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other event
P	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
T	document published after the international filing date or priority date but not in relation with the application but cited to understand the state of the art
X	document of particular relevance, the claimed invention being derived from or based on the document
Y	document of particular relevance; the claimed invention being derived from or based on the document
B	document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 December 1992 (15.12.92)	
Date of mailing of the international search report 24 DEC 1992 (24.12.92)	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WOODEN ACT 2606 AUSTRALIA Postcode No. 060 255729	
Authorized officer TAMARA NIZNIK Telephone No. (06) 2523360	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (23 July 1992) COPLJ/M

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X ✓	US A 4508728 (KINOSHITA NAGAI AND KINUKO NAGAI), 2 April 1983 (02.04.83) column 3 lines 20-44, column 8, column 9-11	12-13, 18-21
X ✓	WO A 9006102 (PEPTIDE TECHNOLOGY LIMITED), 14 June 1990 (14.06.90) page 3 lines 11-21	12-13, 18-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet (23 July 1992) COPLJ/M

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO	9006102	AU	43220/89	EP	436611
EP	313634	JP	63014728	US	4927817
US	4717716	CH	666188	DE	3540632
		FR	2577138	GB	2170707
		NL	8600112	SE	8505121
EP	303380	JP	1042471	US	4981846
US	4508728				
END OF ANNEX					

Form PCT/ISA/210 (patent family member (23 July 1992) COPLJ/M

フロントページの続き

(72)発明者 ヒブキッス, アラン ロジャー
イギリス国 SE12 0UF ロンドン
リー デイブルス クローズ 83

(72)発明者 パナジオトパウロス, シアンナ
オーストラリア国 3108 ヴィクトリア
ドンキャスター ライアル コート 2